


gegen EP 0 324 729  
aufgegriffen A 61 L 2/00 P 2 E

AH

19  Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

11 Veröffentlichungsnummer: 0 159 311  
A1

17 EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

NETVER  
VIRINA  
FLUPR  
HEAT

21 Anmeldenummer: 85890044.2

51 Int. Cl.: A 61 L 2/04  
//A61K35/16

22 Anmeldetag: 18.02.85

VO: TEUCHIT I

30 Priorität: 09.03.84-AT 792/84  
11.10.84 AT 3237/84

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
23.10.85 Patentblatt 85/43

64 Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE FR GB IT LI NL SE

71 Anmelder: IMMUNO Aktiengesellschaft für  
chemisch-medizinische Produkte  
Industriestrasse 72  
A-1220 Wien(AT)

72 Erfinder: Eibl, Johann, Dr.  
Gustav Tschermakgasse 2  
A-1180 Wien(AT)

72 Erfinder: Schwarz, Otto, Dr.  
Celtesgasse 5  
A-1190 Wien(AT)

72 Erfinder: Elsinger, Fritz, Dr.  
Eduard Kleingasse 29  
A-1130 Wien(AT)

72 Erfinder: Wöber, Günter, Prof. Dr.  
Carolusstrasse 23  
A-2522 Oberwaltersdorf(AT)

72 Erfinder: Philapitsch, Anton  
Hans Kudlichgasse 5  
A-2490 Ebenfurt(AT)

72 Erfinder: Linnau, Yendra, Dr.  
Lavendelweg 24  
A-1224 Wien(AT)

72 Erfinder: Dorner, Friedrich, Prof. Dr.  
Peterlinigasse 17  
A-1230 Wien(AT)

72 Erfinder: Trambauer, Karl, Ing.  
Steudlgasse 37-39/1/8  
A-1100 Wien(AT)

72 Erfinder: Frechinger, Wolfgang  
Nordmannngasse 22  
A-1210 Wien(AT)

74 Vertreter: Wolfram, Gustav, Dipl.-Ing.  
Schwindgasse 7 P.O. Box 205  
A-1041 Wien(AT)

54 Verfahren zur Inaktivierung von vermehrungsfähigen filtrierbaren Krankheitserregern in Blutprodukten.

57 Es wird ein Verfahren zur Inaktivierung von Viren in Blutprodukten beschrieben, wobei die Blutprodukte in feuchtem oder in festem Zustand in Gegenwart von anorganischen oder organischen hydroxylgruppenhaltigen Verbindungen mit einer  $H^+$ -Dissoziationskonstante vor  $<10^{-11}$  in einer Konzentration von größer als 0,05 (5 Gew.%) und kleiner als 0,70 (70 Gew.%) hitzebehandelt werden. Als hydroxylgruppenhaltige Verbindungen sind Wasser, Methanol, Äthanol oder Mannit beschrieben. Die Temperatur kann bis zu 121°C, die Dauer der Hitzebehandlung 1 s bis 100 h betragen.

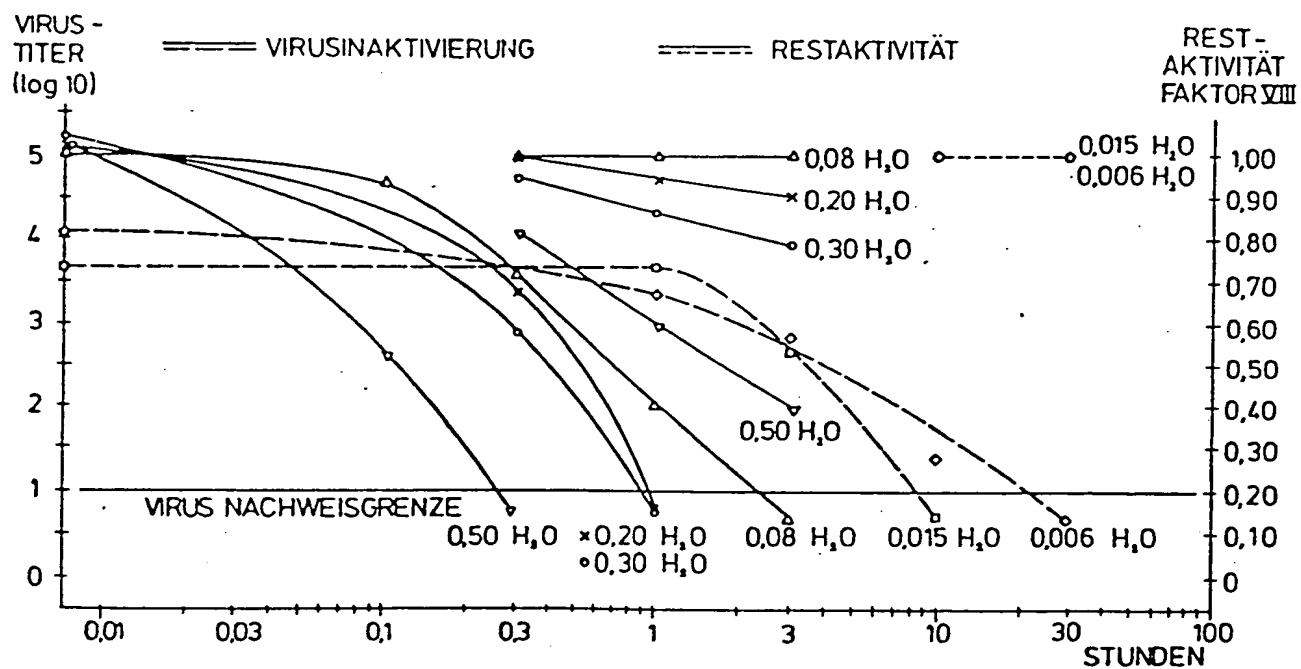
Das beschriebene Inaktivierungsverfahren kann angewendet werden zur Herstellung von Blutprodukten, ausgewählt aus Enzymen, Proenzymen einschließlich Gerinnungsfaktoren, Enzyminhibitoren, Immunglobulinen, Albumin, Plasminogen, Fibrinogen, Fibronectin oder Plasma, wobei durch die Inaktivierung etwa vorhandene vermehrungsfähige filtrierbare Krankheitserreger unschädlich gemacht werden.

EP 0 159 311 A1

// (A 61 L 2/00 P 2 E, 2/04)

./...

FIG.1 INAKTIVIERUNG EINES MODELLVIRUS (SINDBIS-VIRUS) UND RESTAKTIVITÄT VON  
FAKTOR VIII BEIM ERHITZEN EINER FAKTOR VIII - PRÄPARATION AUF 60° C



Verfahren zur Inaktivierung von vermehrungsfähigen filtrierbaren Krankheitserregern in Blutprodukten

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Inaktivierung von vermehrungsfähigen filtrierbaren Krankheitserregern, insbesondere Hepatitisviren und unbekannten Erregern, die eventuell AIDS (acquired immune deficiency syndrome) übertragen können, in Blutprodukten unter Anwendung erhöhter Temperatur sowie ein Verfahren zur Herstellung von Blutprodukten unter Anwendung dieses Verfahrens.

Unter Blutprodukten werden Produkte aus menschlichem oder tierischem Blut bzw. Plasma verstanden, die zur therapeutischen, prophylaktischen oder diagnostischen Anwendung bestimmt sind. Solche Produkte können Enzyme, Proenzyme einschließlich Gerinnungsfaktoren, Enzyminhibitoren, Immunglobuline, Albumin, Plasminogen, Fibrinogen, Fibrinogen oder Plasma enthalten.

Es ist eine umfangreiche Literatur vorhanden, die sich mit der Hitzeinaktivierung von vermehrungsfähigen filtrierbaren Krankheitserregern in Blutprodukten befaßt.

Die verschiedenen Verfahren umfassen:

- Erhitzen der Blutprodukte in wässriger Lösung, gegebenenfalls unter Zusatz viruzider Substanzen,
- Erhitzen der Blutprodukte in wässriger Lösung in Anwesenheit von Stabilisatoren,
- Behandeln der Blutprodukte mit organischen Lösungsmitteln,
- Bestrahlen der Blutprodukte in festem Zustand,
- Erhitzen der Blutprodukte in trockenem Zustand.

Das Bestreben bei allen diesen Inaktivierungsverfahren geht dahin, die potentielle Infektivität der Präparationen aufzuheben, ihre biologische Aktivität aber weitgehend zu erhalten. Dieses Ziel konnte jedoch bisher nur bei  
5 Albuminpräparationen erreicht werden, u.zw. durch Erhitzen von wässrigen Albuminlösungen bei einer Temperatur von 60°C während 10 h, da Albumin wesentlich stabiler gegenüber Hitzeeinwirkung ist als alle anderen Blutproteine.

10

Im einzelnen sind zum Stand der Technik beispielsweise die folgenden Literaturstellen anzuführen:

Die DE-OS 29 16 711 beschreibt ein Verfahren zur Behandlung von Gerinnungsfaktoren enthaltenden Präparationen  
15 in wässriger Lösung unter Anwendung einer Temperatur von 30 bis 100°C, wobei der Lösung der Gerinnungsfaktoren eine Aminosäure und ein Mono-, Oligosaccharid oder Zuckeralkohol zugesetzt werden.

20

Die EP-A2 - 0 053 338 beschreibt ein Verfahren zur Inaktivierung von Hepatitis-Viren in Faktor IX und X enthaltenden Präparationen, wobei eine Erwärmung der wässrigen Lösung eines Blutpräparates in Gegenwart von Calcium-  
25 ionen und gegebenenfalls einer Aminosäure und/oder eines Saccharides oder Zuckeralkoholes bei Temperaturen von bis zu 100°C vorgenommen wird.

In der EP-A2 - 0 035 204 wird ein Verfahren zur Inaktivierung von wässrigen Proteinelösungen, die Faktor VIII, Fibrinogen und andere Proteine  
30 enthalten können, beschrieben, wobei die Komposition mit einem Polyol gemischt und die Mischung auf eine Temperatur von 60 bis 75°C erhitzt wird.

35

In der EP-A2 - 0 052 827 ist ein Verfahren zur Inakti-

vierung von Hepatitis-Viren in einer wässrigen, die Faktoren II und VII enthaltenden Lösung in Anwesenheit eines Chelatbildners und gegebenenfalls einer Aminosäure und/oder eines Saccharides oder Zuckeralkoholes beschrieben.

In der US-A - 4,379,085 ist ein Verfahren zur Hitzeinaktivierung eines Plasmaproteins, wie C<sub>1</sub>-Inhibitor oder Faktor IX, in wässriger Lösung in Gegenwart von Kalium- oder Ammoniumcitrat beschrieben.

In der EP-A2 - 0 077 870 ist ein Inaktivierungsverfahren beschrieben, bei welchem eine wässrige, Faktor VIII enthaltende Lösung mit Aminosäuren, Monosacchariden, Oligosacchariden, Zuckeralkoholen und Kohlenwasserstoff- oder Hydroxylkohlenwasserstoffcarbonsäuren mit 3 bis 10 Kohlenstoffatomen auf eine Temperatur von 50 bis 80°C erhitzt wird.

In der PCT-Anmeldung WO 83/04371 ist ein Verfahren zum Inaktivieren von Hepatitis-Viren beschrieben, wobei eine das Virus enthaltende Präparation bei einer Temperatur von 4 bis 40°C mit einem Halogenkohlenwasserstoff, insbesondere Chloroform, behandelt wird.

Die EP-B1 - 0 015 055 beschreibt ein Verfahren zur Behandlung eines Blutproduktes, wobei das Produkt in wasserfreiem Zustand einer Mikrowellenbestrahlung ausgesetzt wird, um vorhandene Mikroorganismen zu inaktivieren.

Rosenberg et al. beschreiben in einer Abhandlung des XII. International Congress on Blood Transfusion, Abstracts, "MIR" Publishers, Moscow 1969, pp. 473-475 ein Verfahren zur Inaktivierung von albuminhaltigen Präparationen und Fibrinogen in trockenem Zustand durch 10-stündiges Erhitzen auf 60°C.

Die EP-A2 - 0 094 611 beschreibt ein Verfahren zur Behandlung einer Faktor VIII enthaltenden Komposition im trockenen Zustand mit weniger als 5 Gew. % (0,05) Wasser, unter Anwendung einer Temperatur von wenigstens 60°C zwecks Inaktivierung von vorhandenen Hepatitis-Viren.

Die veröffentlichte PCT-Anmeldung WO 82/03871 beschreibt ein Verfahren zur Behandlung von Blutgerinnungsenzyme enthaltenden Zubereitungen, wobei diese zur Inaktivierung vorhandener infektiöser Viren im trockenen Zustand erhitzt werden; als trockener Zustand wird ein solcher mit weniger als 5 Gew. % (0,05) Wasser definiert.

Wie aus der vorhergehenden Übersicht hervorgeht, sind sowohl Verfahren bekannt, bei denen die zu behandelnde, Blutproteine enthaltende Präparation in wässriger Lösung oder in einem organischen Lösungsmittel suspendiert vorliegt, als auch Verfahren, bei denen die Präparation in trockenem Zustand, z.B. lyophilisiert, der Inaktivierungsbehandlung unterworfen wird. Trotz aller bisherigen Anstrengungen ist es bisher nicht gelungen, eine Inaktivierungsmethode zu entwickeln, die - vergleichbar mit der Inaktivierung des Blutproduktes Albumin - gleichermaßen eine Sicherheit gegen Übertragung von Hepatitis-Viren und anderen pathogenen Viren gewährleistet und die Erhaltung der biologischen Aktivität des jeweiligen Blutproduktes sicherstellt. Seit 30 Jahren werden albuminhaltige Lösungen, die in Anwesenheit von geeigneten Stabilisatoren 10 h auf 60°C erhitzt worden sind, millionenfach klinisch angewandt, ohne daß dadurch Infektionserkrankungen übertragen worden wären. Wie in Experimenten mit Schimpansen gezeigt werden konnte, werden Hepatitis-Viren, die albuminhaltigen Lösungen zugesetzt wurden, durch Erhitzen dieser Lösungen auf 60°C während 10 h vollständig inaktiviert.

Die Erfindung stellt sich die Aufgabe, ein Inaktivierungs-  
verfahren zu schaffen, das bei Erhaltung der biologischen  
Aktivität des zu behandelnden Blutproduktes eine zuver-  
lässige Sicherheit gegenüber Viren, insbesondere Hepatitis-  
5 Viren, erzielt, die der bei der Inaktivierung von albu-  
minhaltigen Lösungen erreichbaren Effizienz gleichwertig  
oder sogar überlegen ist.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß bei einem Verfahren  
10 der eingangs beschriebenen Art dadurch gelöst, daß die  
Blutprodukte in feuchtem oder in festem Zustand in Gegen-  
wart von anorganischen oder organischen hydroxylgruppen-  
hältigen Verbindungen mit einer  $H^+$ -Dissoziationskonstante  
von  $<10^{-11}$  bei einer Temperatur im Bereich bis zu  $121^{\circ}C$  hitze-  
15 behandelt werden, wobei die Konzentration der hydroxyl-  
gruppenhältigen Verbindungen größer als 0,05 (5 Gew.%)  
und kleiner als 0,70 (70 Gew.%) ist. Der zulässige Wasser-  
gehalt ist zum Teil vom Blutprodukt, welches der Behandlung  
unterzogen wird, abhängig; jedenfalls muß der feste Zustand  
20 des Produktes erhalten bleiben, d.h. eine flüssige Kon-  
sistenz vermieden werden.

Da die notwendigen Untersuchungen über Hepatitis-Virus-  
inaktivierung in Blutprodukten nicht sofort beim Menschen  
25 vorgenommen werden können und Schimpansen nur in unge-  
nüglicher Zahl zur Verfügung stehen, erfolgt erfindungs-  
gemäß die Bewertung der Wirksamkeit der Inaktivierung  
mit Hilfe von Modellviren. Am Beispiel von Hundehepatitis-  
virus als Modellvirus konnte gezeigt werden, daß die ein-  
30 gangs erwähnten bekannten Verfahren zur Virusinaktivierung  
von Blutprodukten dem Inaktivierungsverfahren in Albumin  
weit unterlegen sind. So wird z.B. Hundehepatitisvirus  
in Proteinlösungen in Anwesenheit von 0,50 Saccharose  
und 2M Glycin als Stabilisatoren nicht inaktiviert; eben-  
35 so nicht in Faktor VIII-Präparationen in trockenem Zu-  
stand bei Erhitzen auf  $60^{\circ}C$  während 10 h. Hundehepatitis-

viren werden jedoch in Albuminlösungen bei Erhitzung auf 60°C während 10 h vollständig inaktiviert. Das gleiche gilt für E. Coli Bakteriophagen T4.

- 5 Bei der Bewertung des erfindungsgemäßen Verfahrens hat sich gezeigt, daß Hundehepatitisvirus und andere Modellviren vollständig inaktiviert werden. Die Inaktivierungsgeschwindigkeit von E. Coli Bakteriophagen T4 in beliebigen Blutprodukten in Anwesenheit der erfindungsgemäß wirk-
- 10 samen Menge an hydroxylgruppenhaltigen Verbindungen ist sogar größer als in einer auf 60°C erhitzten Albuminlösung.

Die Dauer der erfindungsgemäßen Hitzebehandlung kann in weiten Grenzen variiert werden, je nach der angewandten

15 Temperatur und der Art bzw. Hitzeempfindlichkeit der zu behandelnden Blutprodukte. Sie kann zwischen 1 s und 100 h betragen.

- Als hydroxylgruppenhaltige Verbindungen mit einer H<sup>+</sup>-
- 20 Dissoziationskonstante von  $<10^{-11}$ , die erfindungsgemäß eingesetzt werden können, kommen insbesondere Wasser, Methanol, Äthanol oder Mannit in Betracht, wobei die Konzentration dieser Verbindungen vorzugsweise 0,05 bis 0,40 beträgt. Die H<sup>+</sup>-Dissoziationskonstante von Wasser beträgt
- 25  $10^{-14}$ , die von Methanol  $10^{-15}$ , von Äthanol  $10^{-15}$  und von Mannit weniger als  $10^{-17}$ .

- Bei Verwendung von Wasser besteht eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung darin, daß die Hitzebehandlung
- 30 an Präparationen, die 0,06 bis 0,30 Wasser enthalten, bei einer Temperatur von 50 bis 90°C durchgeführt wird. Weiters hat es sich als sehr günstig erwiesen, daß die Hitzebehandlung der Blutprodukte in Gegenwart eines sauerstofffreien inerten Schutzgases, vorzugsweise Stickstoff
- 35 und allenfalls in Gegenwart von sauerstoffbindenden Substanzen durchgeführt wird. Bei der Ausführungsform mit Schutzgas hat sich herausgestellt, daß die Restaktivi-



täten bzw. Ausbeuten der Blutprodukte, insbesondere von Gerinnungsfaktoren, wesentlich höher sind als beim Erhitzen in sauerstoffhaltiger Atmosphäre, während die Virusinaktivierung hinsichtlich Ausmaß und Geschwindigkeit  
5 gleich hoch ist.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens kann auch darin bestehen, daß die Blutprodukte in einem flüssigen Medium, in dem sie unlöslich  
10 sind, hitzebehandelt werden. Als flüssiges Medium kann Chloroform oder Essigsäureäthylester verwendet werden.

Nach einer abgeänderten Ausführungsform werden die Blutprodukte mit hydroxylgruppenhaltigen gasförmigen Verbindungen behandelt, mit der Maßgabe, daß in den Blutprodukten die Konzentration der hydroxylgruppenhaltigen Verbindungen von größer als 0,05 (5 Gew.%) und kleiner als 0,70 (70 Gew.%), vorzugsweise kleiner als 0,40 (40 Gew.%)  
15 erreicht wird. Im Rahmen dieser Ausführungsform können z.B. die Blutprodukte in festem Zustand mit Wasserdampf von einem Druck bzw. Partialdruck zwischen 0,1 und 2 bar  
20 behandelt werden.

Das erfindungsgemäße Inaktivierungsverfahren läßt sich  
25 mit Vorteil bei einem Verfahren zur Herstellung von Blutprodukten, ausgewählt aus Enzymen, Proenzymen einschließ-

lich Gerinnungsfaktoren, Enzyminhibitoren, Immunglobulinen, Albumin, Plasminogen, Fibrinogen, Fibronectin oder Plasma oder Mischungen einzelner Blutprodukte anwenden, wobei die Inaktivierung in einer beliebigen Stufe des Herstellungsverfahrens vorgenommen wird, worauf gegebenenfalls die Blutprodukte in eine galenische Zubereitung übergeführt werden.

In den Rahmen des erfindungsgemäßen Herstellungsverfahrens fällt auch die Arbeitsweise, daß ein Blutprodukt verwendet wird, welches kovalent an eine wasserunlösliche Matrix gebunden ist. Beispielsweise kann Immunglobulin an Sepharose immobilisiert und der Inaktivierung unterworfen werden. Andererseits ist es möglich, daß ein Blutprodukt auf einen gewebekompatiblen Träger, wie ein Kollagenvlies, nicht kovalent adsorbiert und hitzebehandelt wird. Eine besondere Ausführungsform bei der Herstellung einer fibrinogenhaltigen Präparation besteht darin, daß auf einen gewebekompatiblen Träger, wie ein Kollagenvlies, eine fibrinogenhaltige Komposition aufgebracht und hitzeinaktiviert wird.

Im Rahmen des erfindungsgemäßen Herstellungsverfahrens können auch weitere Fraktionierungsmaßnahmen angewendet werden, um die hitzeinaktivierten Blutprodukte von während der Hitzeinaktivierung allenfalls gebildeten Neoproteinen oder Neoantigenen zu befreien.

Das erfindungsgemäße Inaktivierungsverfahren sowie die Herstellung von Blutprodukten unter Anwendung des Verfahrens, die erreichten Wirkungen und die Überlegenheit gegenüber bekannten Verfahren ist in den folgenden Beispielen und Tabellen näher erläutert.

Beispiel 1:

a) Herstellung einer Faktor VIII-Präparation

6660 ml frisch gefrorenes Plasma wurde bei 0°C bis +4°C aufgetaut. Das entstandene Kryopräzipitat wurde durch Zentrifugieren abgetrennt und in 700 ml Trinatriumcitrat-Lösung, die 0,05 mg Natriumpentosansulfat pro ml und  
5 30 Einheiten Aprotinin pro ml enthielt, gelöst. Der pH-Wert der Lösung wurde auf 6,3 und die Temperatur auf +4°C gestellt. Der entstandene Niederschlag wurde durch Zentrifugieren abgetrennt und verworfen.

10 Durch Zugabe von Äthanol bis zu einer Konzentration von 0,08 wurde die Faktor VIII-hältige Fraktion ausgefällt. Der entstandene Niederschlag wurde durch Zentrifugieren abgetrennt und in einem Glycin-Citrat-NaCl-Puffer gelöst.

15 b) Inaktivierung eines Modellvirus

Die in beschriebener Weise erhaltene Faktor VIII-hältige Lösung wurde auf 50 mg Protein/ml eingestellt, mit einer Sindbis-Virussuspension in Zellkulturmedium TCM 199 bzw. mit  
20 virusfreiem TCM 199 versetzt und gefriergetrocknet. Das gefriergetrocknete Faktor VIII-Konzentrat wurde auf verschiedene Wassergehalte, u.zw. auf 0,08, auf 0,20, auf 0,30 und auf 0,50 eingestellt und in geschlossenen Behältern bei  
25 einer Temperatur von 60°C bzw. 80°C verschieden lang erhitzt. Je drei Proben wurden vor dem Erhitzen und zu bestimmten Zeiten während des Erhitzungsvorganges zur Messung des Virustiters einerseits und der Restaktivität und des Wassergehaltes andererseits entnommen.

30 Die Bestimmung des Virustiters wurde in folgender Weise durchgeführt:

Das Faktor VIII enthaltende Lyophilisat wurde in Wasser gelöst und mit isotoner Kochsalzlösung im Verhältnis  
35 1 : 10 seriell verdünnt. Der Titer des Sindbis-Virus wurde durch Bewertung des zytopathischen Effektes auf

sensitive Vero-Zellen in der Mikrotiterplatte bestimmt. Die Ergebnisse wurden nach statistischer Behandlung der Auswertung entsprechend der Formel von Reed und Muench als Logarithmus  $TCID_{50}$  ausgedrückt (Reed J.L. and H. Muench; 5 Amer.J.Hyg. 27, 493, (1938)).

c) Bestimmung der Restaktivität an virusfreien Proben

Die Bestimmung der Restaktivität an Faktor VIII erfolgte 10 mit Hilfe des Thromboplastin-Bildungs-Tests (2-Stufen-Test). Die Faktor VIII-Restaktivität wurde berechnet durch Bildung des Quotienten aus der Faktor VIII-Aktivität der erhitzten Probe und der Faktor VIII-Aktivität der ent- 15 sprechenden nicht erhitzten Probe.

d) Bestimmung des Wassergehaltes an virusfreien Proben

Das gefriergetrocknete Faktor VIII-Konzentrat wurde vor und nach 20 der Hitzebehandlung mit wasserfreiem Methanol extrahiert. Der Wassergehalt der Methanollösung wurde nach Karl Fischer in einem Titrator nach dem coulometrischen Verfahren be- 25 stimmt (Scholz, E.; Fresenius' Z. anal. Chem. 314, 557-571, (1983)).

Die nach erfolgter Hitzebehandlung gemessenen Virustiter 25 und die nach der Behandlung noch vorhandene Restaktivität sind der Tabelle I zu entnehmen, woraus sich deutlich ergibt, daß die Inaktivierungsgeschwindigkeit vom Wassergehalt abhängig ist. Während bei der Anwendung von 30 einer Temperatur von 60°C die Nachweisgrenze des Virus bei einem Wassergehalt von 0,08 nach 3 h erreicht wird, wird diese Grenze bei einem Wassergehalt von 0,20 und 0,30 schon nach einer Stunde und bei einem Wassergehalt von 0,50 schon nach 0,3 h erreicht. Der Inaktivierungseffekt 35 ist auch von der Temperatur abhängig. Bei einer Temperatur von 80°C und einem Wassergehalt von 0,08 wird die Nachweisgrenze des Virus schon nach 0,3 h erreicht.

Die Restaktivität nach der Inaktivierungsbehandlung war bei allen Proben mit einem Wassergehalt bis zu 0,30 mit mindestens 0,80 (80 %) zufriedenstellend, selbst bei einem Wassergehalt von 0,50 betrug die Restaktivität nach 3 h bei 60°C noch 0,38 (38 %).

- 5 Im Vergleich dazu wurden Faktor VIII-Konzentrate, die in gleicher Weise wie oben beschrieben hergestellt worden waren, in "trockenem Zustand" behandelt, d.h. mit einem nach dem Stand der Technik dem "trockenen Zustand" zugeordneten Wassergehalt von weniger als 0,05 Wasser. Die
- 10 Ergebnisse sind in der Tabelle I a) angegeben, woraus zu ersehen ist, daß bei dem niedrigen Wassergehalt, der dem "trockenen Zustand" entspricht, die Nachweisgrenze des Virus bei einem Wassergehalt von 0,015 erst nach
- 15 10 h, bei einem Wassergehalt von 0,006 erst nach 30 h erreicht wird. Daraus ergibt sich, daß das erfindungsgemäße Verfahren 10- bis 100-fach wirksamer ist bei der Verminderung eines Virustiters um 3 bis 4 Zehnerpotenzen.
- 20 Diese Überlegenheit des erfindungsgemäßen Verfahrens gegenüber dem Stand der Technik ergibt sich anschaulich auch aus den Virusinaktivierungskurven in Fig. 1 der Zeichnung, wobei die voll ausgezogenen Kurven die erfindungsgemäße Inaktivierung bei 0,50, 0,30, 0,20 bzw. 0,08 H<sub>2</sub>O und die strich-
- 25 liert gezeichneten Kurven den Virustiterabfall in "trockenem Zustand" von 0,015 H<sub>2</sub>O und 0,006 H<sub>2</sub>O veranschaulichen. Auf der Abszisse der Fig. 1 ist die Zeitdauer der Behandlung in Stunden im logarithmischen Maßstab angegeben, auf der Ordinate der Virustiter im logarithmischen Maßstab. Zusätzlich ist in Fig. 1 der Verlauf der
- 30 Restaktivität angegeben, wobei die voll ausgezogenen Kurven für den erfindungsgemäßen Wassergehalt und die strichlierten Kurven für den Restaktivitätsverlauf in trockenem Zustand stehen.
- 35 Beispiel 2:  
Eine in gleicher Weise wie in Beispiel 1 hergestellte Faktor VIII-hältige Lösung wurde mit einer Sindbis-Virus-

suspension in Zellkulturmedium TCM 199 bzw. mit virusfreiem TCM 199 versetzt und gefriergetrocknet. Das gefriergetrocknete Faktor VIII-Konzentrat wurde in Gegenwart von Methanol bei einer Temperatur von 60°C der Inaktivierungsbehandlung unterworfen. Eine weitere Faktor VIII-hältige Lösung wurde mit Mannit versetzt, gefriergetrocknet und ebenfalls bei 60°C hitzeinaktiviert.

Die nach erfolgter Hitzebehandlung gemessenen Virustiter sind aus den Tabellen II und III zu entnehmen, wobei in den Tabellen IIa und IIIa die Vergleichsergebnisse ohne den erfindungsgemäßen Gehalt an hydroxylgruppenhaltigen Verbindungen angegeben sind. Wieder ist die Überlegenheit der erfindungsgemäßen Arbeitsweise deutlich, indem bei dieser die Inaktivierungsgeschwindigkeit des Modellvirus bei Erhaltung der Restaktivität wesentlich größer ist.

Beispiel 3:

a) Herstellung einer den partiellen Prothrombinkomplex enthaltenden Präparation:

Eine die Gerinnungsfaktoren II, IX und X enthaltende Präparation wurde nach der in Vox. Sang. 33, 37 - 50 (1977) beschriebenen Methode aus menschlichem Plasma durch Adsorption an DEAE-Sephadex, Waschen des Ionenaustauschers und Elution des Komplexes gewonnen.

b) Inaktivierung eines Modellvirus

Das Eluat wurde dialysiert, gefriergetrocknet und daraus eine wässrige Lösung des partiellen Prothrombinkomplexes mit einem Gehalt von 50 mg Protein/ml bereitet. Die Lösung wurde mit einer Suspension des Bakteriophagen T4 in Kulturmedium für Escherichia coli 11303 bzw. mit virusfreiem Kulturmedium versetzt und gefriergetrocknet.

Das gefrierge-

trocknete Konzentrat wurde auf einen Wassergehalt von 0,09 eingestellt. Geschlossene Behälter mit gefriergetrockneten partiellen Prothrombinkomplex-Proben - mit und ohne Virus - wurden bei einer Temperatur von 60°C verschieden lang erhitzt. Je drei Proben wurden vor dem Erhitzen und zu bestimmten Zeiten während des Erhitzungsvorganges zur Messung des Virustiters einerseits und der Restaktivität und des Wassergehaltes andererseits entnommen.

10

Die Bestimmung des Virustiters wurde in folgender Weise durchgeführt:

Das den partiellen Prothrombinkomplex enthaltende Lyophilisat wurde nach der Hitzebehandlung in Wasser gelöst und mit 1 mM  $MgCl_2$  im Verhältnis 1 : 10 seriell verdünnt. Eine Mischung von 3 ml 0,7 % Bacto-Agar, 43 bis 45°C, 100  $\mu$ l Suspension von E. coli in Flüssigmedium und 200  $\mu$ l der bakteriophagenhaltigen Probe bzw. Verdünnung wurden durchgemischt und rasch auf einer Nähragarplatte (ATCC 129) ausgegossen. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden mit Hilfe eines Zählgerätes die durch vermehrungsfähige Viruspartikel erzeugten Plaques im konfluenten Zellrasen gezählt (PFU, plaque-forming units). Die Ergebnisse wurden als  $\log_{10}$  PFU ausgedrückt.

25

c) Bestimmung der Restaktivität an virusfreien Proben

Die Bestimmung der Faktor IX-Aktivität erfolgte durch Zusatz der zu testenden Probe zu einem Faktor IX-Mangelplasma und Bestimmung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (1-Stufen-Test). Die Faktor IX-Restaktivität einer erhitzten Probe wurde berechnet durch Bildung des Quotienten aus der Faktor IX-Aktivität der erhitzten Probe und der Faktor IX-Aktivität der entsprechenden nicht erhitzten Probe.

30

35

d) Bestimmung des Wassergehaltes an virusfreien Proben

Diese Bestimmung erfolgte in gleicher Weise, wie in Beispiel 1 beschrieben.

5

Die nach erfolgter Hitzebehandlung gemessenen Virustiter und die nach der Behandlung noch vorhandene Restaktivität sind der Tabelle IV zu entnehmen, woraus sich ergibt, daß die Nachweisgrenze des Virus schon nach kurzer Zeit  
10 - weniger als 1 h - erreicht wurde, wobei die Restaktivität voll erhalten blieb. Im Vergleich dazu ist aus der Tabelle IVa zu ersehen, daß bei einer Hitzebehandlung partieller Prothrombinkomplex-Präparationen in "trockenem Zustand" bei einem Wassergehalt von 0,004 selbst nach zehn-  
15 stündiger Behandlung der Virustiter mit 2,0 noch relativ hoch war, sogar bei Anwendung von höheren Temperaturen von 80 und 90°C.

Die Virusinaktivierungskurven und der Verlauf der Restaktivitäten nach diesem Beispiel sind in Fig. 2 in gleicher Weise wie in Fig. 1 veranschaulicht mit voll ausgezogenen Linien dargestellt, wogegen die nach dem Stand der Technik im trockenen Zustand erhaltenen Kurven strichliert angegeben sind.

25

Beispiel 4:

a) Herstellung einer den totalen Prothrombinkomplex enthaltenden Präparation

30 Eine den Gerinnungsfaktor VII enthaltende Präparation wurde nach der in der AT-PS 359.646 beschriebenen Methode aus menschlichem Zitratplasma hergestellt. Nach Abtrennung des Kryopräzipitates und einer DEAE-Sephadexbehandlung wurde Faktor VII an  $\text{Al}(\text{OH})_3$  adsorbiert.  $\text{Al}(\text{OH})_3$  wurde  
35 einem Waschprozeß und einem Faktor VII-Elutionsprozeß bei erhöhter Ionenstärke unterworfen. Das Faktor VII-hältige



Eluat wurde dialysiert und mit dem dialysierten partiellen Prothrombinkomplex-Präparat, hergestellt nach Beispiel 3, in solchem Verhältnis gemischt, daß die Gerinnungsaktivitäten der Faktoren II, IX, X und VII ungefähr gleich  
5 hoch waren.

b) Inaktivierung eines Modellvirus

Die in beschriebener Weise erhaltene Lösung des totalen  
10 Prothrombinkomplexes wurde auf 50 mg Protein/ml eingestellt und mit einer Sindbis-Virussuspension in Zellkulturmedium TCM 199 bzw. mit virusfreiem TCM 199 versetzt und gefriergetrocknet. Das gefriergetrocknete Konzentrat wurde auf einen Wassergehalt von 0,07 eingestellt. Geschlossene Behälter mit den gefriergetrockneten totalen  
15 Prothrombinkomplex-Proben - mit und ohne Virus - wurden bei einer Temperatur von 60°C verschieden lang erhitzt. Je drei Proben wurden vor dem Erhitzen und zu bestimmten Zeiten während des Erhitzungsvorganges zur Messung des  
20 Virustiters einerseits und der Restaktivität und des Wassergehaltes andererseits entnommen.

Die Bestimmung des Virustiters erfolgte in gleicher Weise, wie in Beispiel 1 beschrieben.  
25

c) Bestimmung der Restaktivität an virusfreien Proben

Die Bestimmung der Faktor IX-Aktivität erfolgte durch Zusatz der zu testenden Probe zu einem Faktor IX-Mangelplasma und Bestimmung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (1-Stufen-Test). Die Faktor IX-Restaktivität einer erhitzten Probe wurde berechnet durch Bildung des Quotienten aus der Faktor IX-Aktivität der erhitzten Probe und der Faktor IX-Aktivität der entsprechenden nicht erhitzten Probe.  
35

d) Bestimmung des Wassergehaltes an virusfreien Proben

Diese Bestimmung erfolgte in gleicher Weise, wie in Beispiel 1 beschrieben.

5

Die nach erfolgter Hitzebehandlung gemessenen Virustiter und die nach der Behandlung noch vorhandene Restaktivität sind aus der Tabelle V zu entnehmen, woraus sich ergibt, daß nach einer Behandlungszeit von 3 h die Nachweisgrenze des Virus erreicht wurde, wobei die Restaktivität im wesentlichen erhalten blieb.

10

Beispiel 5:

a) Herstellung einer FEIBA-Präparation

15

Eine FEIBA enthaltende Präparation wurde aus frisch gefrorenem menschlichem Zitratplasma nach der in der AT-PS 368.883 beschriebenen Methode hergestellt, indem nach Auftauen des Plasmas, Abtrennen des dabei anfallenden Kryopräzipitates und Generieren der FEIB-Aktivität die Gerinnungsfaktoren durch Adsorption an einen Ionenaustauscher und Elution gewonnen wurden.

20

b) Inaktivierung eines Modellvirus

25

Die erhaltene FEIBA-hältige Lösung wurde auf 50 mg Protein/ml eingestellt und mit einer Sindbis-Virussuspension in Zellkulturmedium TCM 199 bzw. mit virusfreiem TCM 199 versetzt und gefriergetrocknet. Das gefriergetrocknete FEIBA-Konzentrat wurde auf verschiedene Wassergehalte, u.zw. auf 0,07, 0,08 bzw. auf einen Äthanolgehalt von 0,10 eingestellt und in geschlossenen Behältern bei verschiedenen Temperaturen, nämlich 60°C und 90°C, verschieden lang erhitzt. Je drei Proben wurden vor dem Erhitzen und zu bestimmten Zeiten während des Erhitzungsvorganges zur Messung des Virustiters einerseits und zur Bestimmung

30

35

der Restaktivität und des Wassergehaltes andererseits entnommen.

Die Bestimmung des Virustiters erfolgte in gleicher Weise,  
5 wie in Beispiel 1 beschrieben.

c) Bestimmung der Restaktivität an virusfreien Proben

Die Bestimmung der FEIB-Restaktivität erfolgte, wie in  
10 der AT-PS 350.726 beschrieben, durch Zusatz der zu testenden Probe zu einem Faktor VIII-Inhibitorplasma und Bestimmung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (1-Stufen-Test). Die FEIB-Restaktivität einer erhitzten Probe wurde berechnet durch Bildung des Quotienten aus  
15 der FEIB-Aktivität der erhitzten Probe und der FEIB-Aktivität der entsprechenden nicht erhitzten Probe.

d) Bestimmung des Wassergehaltes an virusfreien Proben

20 Diese Bestimmung erfolgte in gleicher Weise, wie in Beispiel 1 beschrieben.

Die nach erfolgter Hitzebehandlung gemessenen Virustiter und die nach der Behandlung noch vorhandene Restaktivität  
25 sind der Tabelle VI zu entnehmen, woraus sich ergibt, daß die Inaktivierungsgeschwindigkeit sowohl vom Wassergehalt als auch von der Inaktivierungstemperatur abhängig ist. Bei einem Wassergehalt von 0,07 und einer Temperatur von 60°C wird die Nachweisgrenze des Virus nach 3 h und  
30 bei einem Wassergehalt von 0,08 und einer Temperatur von 90°C wird die Nachweisgrenze schon nach 0,2 h erreicht. Die Restaktivität ist in allen Fällen zufriedenstellend.

Im Vergleich dazu ist in Tabelle VIa ein Vergleichsbeispiel angegeben, wobei eine FEIBA-Probe in "trockenem  
35 Zustand" mit einem Wassergehalt von 0,009 bei 60°C behan-

delt worden ist. Der Virustiter ist selbst nach 30 h Behandlung noch mit 1,7 relativ hoch.

Die Inaktivierung einer nach diesem Beispiel hergestellten  
5 FEIBA-Präparation wurde zusätzlich an einem zweiten Modellvirus, nämlich an Hundehepatitis-Virus, geprüft, wobei das gefriergetrocknete FEIBA-Konzentrat auf einen Wassergehalt von 0,07 eingestellt wurde und die Behandlungstemperatur 60 bzw. 80°C betrug. Die nach erfolgter Hitze-  
10 behandlung gemessenen Virustiter sind der Tabelle VII zu entnehmen. Der Titer des Hundehepatitis-Virus wurde durch Bewertung des zytopathischen Effektes auf sensitive MDCK-Zellen in der Mikrotiterplatte bestimmt. Die Ergebnisse wurden nach statistischer Behandlung der Auswertung entsprechend der Formel von Reed und Muench als Logarithmus  
15  $TCID_{50}$  ausgedrückt (Reed J.L. and H. Muench; Amer.J.Hyg. 27, 493, (1938)). Aus der Virustiterbestimmung ergab sich, daß bei einem Wassergehalt von 0,07 und einer Temperatur von 60°C die Nachweisgrenze des Virus nach 1 h, bei einer  
20 Temperatur von 80°C schon nach 0,1 h erreicht wurde.

In der Tabelle VIIa ist wieder ein Vergleichsbeispiel angegeben, wobei die Behandlung in "trockenem Zustand" erfolgte, mit dem Ergebnis, daß noch nach 30 h Behandlungszeit die Inaktivierung unzureichend war.  
25

In Fig. 3 sind in gleicher Darstellung wie in Fig. 1 die Virusinaktivierungskurven und die Restaktivitäten nach diesem Beispiel veranschaulicht.  
30

#### Beispiel 6:

##### a) Herstellung einer Immunglobulin-hältigen Präparation

Eine Immunglobulin-hältige Präparation wurde nach der  
35 von Oncley et al. im Journal of Amer.Chem.Soc., 71, 541-550 (1949) beschriebenen Alkohol-Fraktionierungsmethode

aus menschlichem Plasma gewonnen. Die Lösung enthielt 100 mg Protein, 14 mg Glycin und 1,9 mg NaCl pro ml.

b) Inaktivierung eines Modellvirus

5

Die erhaltene wässrige Lösung wurde mit einer Sindbis-Virussuspension in Zellkulturmedium TCM 199 bzw. mit virusfreiem TCM 199 versetzt und gefriergetrocknet. Das gefriergetrocknete Immunglobulinkonzentrat wurde auf einen Wassergehalt von 0,054 eingestellt und in geschlossenen Behältern - mit und ohne Virus - bei einer Temperatur von 60°C verschieden lang erhitzt. Je drei Proben wurden vor dem Erhitzen und zu bestimmten Zeiten während des Erhitzungsvorganges zur Messung des Virustiters einerseits und zur Bestimmung der molekularen Integrität und des Wassergehaltes andererseits entnommen.

Die Bestimmung des Virustiters erfolgte in gleicher Weise, wie in Beispiel 1 beschrieben.

20

c) Bestimmung der molekularen Integrität an virusfreien Proben

Die Bestimmung erfolgte durch Vergleich der Proteinzusammensetzungen der erhitzten und der nicht erhitzten Probe, wobei die Trennung der Proteingemische im elektrischen Feld mittels c<sub>1</sub>) Zelluloseacetat-Elektrophorese und c<sub>2</sub>) SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) erfolgte.

30

c<sub>1</sub>) Mikrozonenelektrophorese auf Zelluloseacetat-Membran (Beckman-System)

Die Elektrophorese erfolgte nach dem Beckman-System (Microzone Electrophoresis Manual, Beckman Instructions 015-083630-C, 1977), wobei die Proben auf einer mit Veronal-

35

puffer (pH 8,6) äquiliibrierten Zelluloseacetat-Membran aufgetragen und hierauf die Proteine bei 250 V (Stromstärke 3 - 4 mA pro Membran, Laufzeit 20 min) getrennt wurden. Nach Fixierung erfolgte Färbung mit Ponceau S,  
5 Trocknung und densitometrische Auswertung der Membran.

## c<sub>2</sub>) SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Trennung der mit Sodium-dodecylsulfat (SDS) beladenen Proteine erfolgte in einem 5 % Polyacrylamid-Gel nach der von Weber und Osborn in "The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoreses", J.Biol.Chem. 244, 4406 (1969) beschriebenen Methode.  
10 Die Färbung der getrennten Proteine erfolgte nach der von Merrill et al. in "Ultrasensitive Stain for Proteins in Polyacrylamide Gels Shows Regional Variation in Cerebrospinal Fluid Proteins", Science 211, 1437 (1981) beschriebenen Methode mit Hilfe des Silberfärbungs-Reagensatzes der Firma BIO-RAD (Bulletin 1089).  
15  
20

## d) Bestimmung des Wassergehaltes an virusfreien Proben

Diese Bestimmung erfolgte in gleicher Weise, wie in Beispiel 1 beschrieben.  
25

Die nach erfolgter Hitzebehandlung gemessenen Virustiter und das Ergebnis der molekularen Integritätsbestimmung sind aus der Tabelle VIII zu entnehmen.  
30

## Beispiel 7:

### a) Herstellung einer C<sub>1</sub>-Esterase-Inhibitor-Präparation

Eine C<sub>1</sub>-Esterase-Inhibitor-hältige Präparation wurde aus humanem Plasma nach der in Vox. Sang. 26, 118 (1974) beschriebenen Methode durch Adsorption an einem Anionen-  
35

austauscher (DEAE-Sephadex) und anschließende Elution gewonnen. Nach Salzfällung zur Abtrennung unerwünschter Proteine wurde die gereinigte  $C_1$ -Esterase-Inhibitor-Präparation gefriergetrocknet.

5

b) Inaktivierung eines Modellvirus

Eine aus dem Lyophilisat der  $C_1$ -Esterase-Inhibitor-Präparation erhaltene wässrige Lösung wurde auf 50 mg Protein/ml eingestellt und mit einer Sindbis-Virussuspension in Zellkulturmedium TCM 199 bzw. mit virusfreiem TCM 199 versetzt und neuerlich gefriergetrocknet. Das Konzentrat wurde auf einen Wassergehalt von 0,10 eingestellt und in geschlossenen Behältern - mit und ohne Virus - bei einer Temperatur von 60°C erhitzt. Je drei Proben wurden vor dem Erhitzen und zu bestimmten Zeiten während des Erhitzungsvorganges zur Messung des Virustiters einerseits und der Restaktivität und des Wassergehaltes andererseits entnommen.

20

Die Bestimmung des Virustiters erfolgte in gleicher Weise, wie in Beispiel 1 beschrieben.

c) Bestimmung der Restaktivität an virusfreien Proben

25

Die Aktivität des  $C_1$ -Esterase-Inhibitors wurde über seine Fähigkeit, die Hydrolyse des chromogenen Substrates Cl-1 (Pentapharm) durch  $C_1$ -Esterase zu hemmen, nach M. Kleindel, H. Lang, A. Philapitsch, G. Wöber, "Thrombosis and Haemostasis", 50, 244 (1983) bestimmt.

30

d) Bestimmung des Wassergehaltes an virusfreien Proben

Diese Bestimmung erfolgte in der Weise, wie in Beispiel 1 beschrieben.

35

Die nach erfolgter Hitzebehandlung gemessenen Virustiter und die nach der Behandlung noch vorhandene Restaktivität sind aus Tabelle IX zu entnehmen.

5 Beispiel 8:

a) Herstellung einer Plasminogen-hältigen Präparation

10 Eine Plasminogen-hältige Präparation wurde nach der von D.G. Deutsch und E.T. Mertz in Science 170, 1095 (1970) beschriebenen Methode hergestellt. 50 ml Lysin-Sepharose wurden in einer Säule mit 0,1 M Phosphat, pH 7,4, äqui-  
libriert. 340 ml Plasma wurden mit Wasser auf 640 ml ver-  
dünnt und die Säule wurde mit dieser Lösung beladen. Nach  
15 der Entfernung von Begleitproteinen durch Waschung mit einer 0,3 M Phosphatlösung (pH 7,4) wurde Plasminogen mit 0,2 M 6-Aminocaprinsäure (pH 7,4) eluiert. Die Plasmino-  
gen-enthaltende Lösung wurde zur Entfernung von  
6-Aminocaprinsäure dialysiert und anschließend gefrierge-  
trocknet.

20

b) Inaktivierung eines Modellvirus

25 Eine aus dem Lyophilisat hergestellte wässrige Lösung des Plasminogens wurde auf 50 mg Protein/ml eingestellt und mit einer Sindbis-Virussuspension in Zellkulturmedium TCM 199 bzw. mit virusfreiem TCM 199 versetzt und neuer-  
lich gefriergetrocknet. Das Konzentrat wurde auf einen  
Wassergehalt von 0,08 eingestellt und in geschlossenen  
Behältern - mit und ohne Virus - bei einer Temperatur von  
30 60°C erhitzt. Je drei Proben wurden vor dem Erhitzen und zu bestimmten Zeiten während des Erhitzungsvorganges zur  
Messung des Virustiters einerseits und der Restaktivität  
und des Wassergehaltes andererseits entnommen.

35 Die Bestimmung des Virustiters erfolgte in gleicher Weise, wie in Beispiel 1 beschrieben.



c) Bestimmung der Restaktivität an virusfreien Proben

Diese Bestimmung erfolgte in der Weise, daß eine Plasminogen-hältige Probe nach der Methode von K.C. Robbins, L. Summaria, Methods in Enzymology, 19, 184-186 (1970) mit Streptokinase zu Plasmin aktiviert und die freigesetzte Plasminaktivität durch Quantitierung der aus Kasein freigesetzten TCA-löslichen Spaltprodukte bestimmt wurde.

Die nach erfolgter Hitzebehandlung gemessenen Virustiter und die nach der Behandlung noch vorhandene Restaktivität sind der Tabelle X zu entnehmen, woraus sich ergibt, daß die Nachweisgrenze des Virus bei zufriedenstellender Restaktivität nach 5 h erreicht wurde.

Beispiel 9:

a) Herstellung einer Plasmapräparation

Blut von gesunden Spendern wurde in einem Blutabnahmebeutel, worin Citrat-Trinatriumcitrat-Lösung enthalten war, abgenommen. Nachdem die Mischung sanft durchmischt wurde, wurde sie zentrifugiert. Das überstehende Plasma wurde abdekantiert; 400 ml Plasma wurden mit 22 ml einer 15 % Glycinlösung, pH 3,6, gemischt.

b) Inaktivierung eines Modellvirus

Das mit Glycin gepufferte Plasma wurde mit einer Sindbis-Virussuspension in Zellkulturmedium TCM 199 bzw. mit virusfreiem TCM 199 versetzt, gefriergetrocknet und auf einen Wassergehalt von 0,08 eingestellt. Geschlossene Behälter mit den Trockenplasma-proben - mit und ohne Virus - wurden bei 60°C verschieden lang erhitzt. Je drei Proben wurden vor dem Erhitzen und zu bestimmten Zeiten während des Erhitzungsvorganges zur Messung des Virustiters einerseits und der Restaktivität und des Wassergehaltes andererseits entnommen.

Die Bestimmung des Virustiters erfolgte in gleicher Weise, wie in Beispiel 1 beschrieben.

c) Bestimmung der Restaktivität an virusfreien Proben

5

Diese Bestimmung erfolgte dadurch, daß die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) des Plasmas ermittelt wurde, indem die Gerinnungszeit eines Gemisches von je 0,1 ml Plasma, Kaolin/Phospholipid-Suspension und 0,025 molarem Calciumchlorid gemessen wurde. Die Restaktivität einer erhitzten Probe wurde berechnet durch Bildung des Quotienten aus der aPTT der nicht erhitzten Probe und der aPTT der entsprechenden erhitzten Probe.

15 d) Bestimmung des Wassergehaltes an virusfreien Proben

Diese Bestimmung erfolgte in gleicher Weise, wie in Beispiel 1 beschrieben.

20 Die nach erfolgter Hitzebehandlung gemessenen Virustiter und die nach der Behandlung noch vorhandene Restaktivität sind der Tabelle XI zu entnehmen, woraus sich ergibt, daß die Nachweisgrenze des Virus bei zufriedenstellender Erhaltung der Restaktivität schon nach 0,3 h erreicht wurde.

25

Beispiel 10:

a) Herstellung einer Fibrinogen- und Fibronectin-hältigen Präparation

30

Nach Abtrennung des Kryopräzipitates und der Prothrombin-komplex-Komponenten aus menschlichem Plasma wurde der anfallende Überstand auf 0°C gekühlt und unter Rühren so viel Äthanol zugesetzt, bis eine Endkonzentration von 0,08 (8%) erreicht wurde. Die Temperatur wurde auf -2°C und der pH-Wert auf 7,0 gestellt. Die Suspension wurde zentri-

35

fugiert und der erhaltene pastenartige Niederschlag, der Fibrinogen und Fibronectin enthielt, so lange mit einer Citrat-Glukose, pH 6,9 - gepufferten 6,5 %igen Äthanollösung gewaschen, bis im Überstand nicht mehr als 0,5 mg Protein/ml nachweisbar waren. Das gereinigte Fibrinogen wurde eingefroren und gefriergetrocknet, um Äthanol zu entfernen.

b) Inaktivierung eines Modellvirus

10 Eine wässrige Lösung des Lyophilisates wurde auf 50 mg Protein/ml eingestellt und mit einer Sindbis-Virussuspension in Zellkulturmedium TCM 199 bzw. mit virusfreiem TCM 199 versetzt und neuerlich gefriergetrocknet. Das  
15 Konzentrat wurde auf einen Wassergehalt von 0,08 eingestellt und in geschlossenen Behältern - mit und ohne Virus - bei einer Temperatur von 60°C erhitzt. Je drei Proben wurden vor dem Erhitzen und zu bestimmten Zeiten während des Erhitzungsvorganges zur Bestimmung des Virustiters einerseits und der Restaktivität und des Wassergehaltes andererseits entnommen.  
20

Die Bestimmung des Virustiters erfolgte in gleicher Weise, wie in Beispiel 1 beschrieben.

25 c) Bestimmung der Restaktivität an virusfreien Proben

Diese Bestimmung erfolgte  
c<sub>1</sub>) mit einem Wirksamkeits-Test (Thrombinzeit), wobei die Wirksamkeit einer Fibrinogen-Lösung nach der  
30 U-S- Pharmacopeia, 16. Revision (USP XVI, 1960), Seite 298, bestimmt wurde, indem eine Probe der Fibrinogenlösung mit Calciumchlorid und Thrombin gemischt und die Gerinnungszeit bestimmt wurde. Die Restaktivität wurde berechnet durch Bildung des Quotienten aus der Gerinnungszeit der nicht erhitzten Probe und der Gerinnungszeit  
35 der erhitzten Probe.

und

c<sub>2</sub>) mit der Bestimmung des clottierbaren Proteins

Das clottierbare Protein einer Fibrinogenlösung wurde nach der USP XVI, Seite 298 bestimmt, indem (1) der Gesamtproteingehalt der Fibrinogenlösung bestimmt wurde (Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl) und (2) der Proteingehalt des nach Thrombinzusatz clottierten Fibrins nach der gleichen Methode (Kjeldahl) bestimmt wurde. Der Quotient aus dem Protein-Wert des Fibrins (2) und dem Protein-Wert des Gesamtproteins (1) ergab das clottierbare Protein.

Die Restaktivität wurde berechnet durch Bildung des Quotienten aus dem clottierbaren Protein der erhitzten Probe und dem clottierbaren Protein der nicht erhitzten Probe.

d) Bestimmung des Wassergehaltes an virusfreien Proben

Die Bestimmung des Wassergehaltes erfolgte in gleicher Weise, wie in Beispiel 1 beschrieben.

Die nach erfolgter Hitzebehandlung gemessenen Virustiter und die nach der Behandlung noch vorhandene Restaktivität sind der Tabelle XII zu entnehmen, woraus sich ergibt, daß die Nachweisgrenze des Virus nach 5 h erreicht wurde, wobei die Restaktivitäten nach den angegebenen Methoden zufriedenstellend waren.

Beispiel 11:

a) Herstellung einer Albumin-hältigen Präparation

Zu 10 l menschlichem Blutplasma wurden bei einem pH-Wert von 7,0 und einer Temperatur von -2°C 0,08 Äthanol zugesetzt, wobei ein Niederschlag, der Fibrinogen enthält, ausfiel. Nach Abtrennen des Niederschlages wurde die Äthanolkonzentration auf 0,25 erhöht und die Temperatur

auf  $-6^{\circ}\text{C}$  gesenkt. Der ausfallende Niederschlag, der Immunglobulin enthielt, wurde abgetrennt und die Äthanolkonzentration des Überstandes, bei einem pH-Wert von 6,5 und einer Temperatur von  $-8^{\circ}\text{C}$ , auf 0,40 erhöht, wobei eine  
5 weitere Fällung erfolgte. Der Niederschlag wurde abgetrennt und verworfen. Zur Ausfällung von Albumin wurde bei gleicher Temperatur der pH-Wert des Überstandes auf 5,4 gestellt. Der Niederschlag wurde durch Zentrifugieren abgetrennt und einem weiteren Reinigungsschritt unter-  
10 worfen, indem er in Wasser gelöst und die Äthanolkonzentration bei einem pH-Wert von 4,8 und einer Temperatur von  $-2^{\circ}\text{C}$  auf 0,10 gestellt wurde. Das ausgefallene Globulin wurde abgetrennt und verworfen. Die Äthanolkonzentration des Überstandes wurde auf 0,40 erhöht, die Temperatur  
15 auf  $-8^{\circ}\text{C}$  gesenkt und der pH-Wert auf 5,1 gestellt. Der Niederschlag ist Albumin und wurde durch Zentrifugieren gesammelt und gefriergetrocknet.

#### b) Inaktivierung eines Modellvirus

20 Eine wässrige Lösung des Lyophilisates wurde auf 50 mg Protein/ml eingestellt und mit Hundehepatitisvirus in Zellkulturmedium TCM 199 bzw. mit virusfreiem TCM 199 versetzt und gefriergetrocknet. Das gefriergetrocknete  
25 Albuminkonzentrat wurde auf einen Wassergehalt von 0,07 eingestellt und in geschlossenen Behältern - mit und ohne Virus - bei  $60^{\circ}\text{C}$  verschieden lang erhitzt. Je drei Proben wurden vor dem Erhitzen und zu bestimmten Zeiten während des Erhitzungsvorganges zur Messung des Virustiters einer-  
30 seits und der molekularen Integrität und des Wassergehaltes andererseits entnommen.

Die Bestimmung des Virustiters erfolgte in gleicher Weise, wie in Beispiel 5 beschrieben. Die Bestimmung der mole-  
35 kularen Integrität, nämlich des Verhaltens in der Zelluloseacetat-Elektrophorese und SDS-Polyacrylamid-Gel-

Elektrophorese, erfolgte in gleicher Weise, wie in Beispiel 6 beschrieben.

c) Bestimmung des Wassergehaltes an virusfreien Proben

5

Diese Bestimmung erfolgte in gleicher Weise, wie in Beispiel 1 beschrieben.

10

Die nach erfolgter Hitzebehandlung gemessenen Virustiter und die molekulare Integrität sind aus der Tabelle XIII zu entnehmen, woraus sich ergibt, daß die Nachweisgrenze des Virus schon nach einer Stunde erreicht wurde und die molekulare Integrität gegenüber nicht erhitzten Kontrollproben keine Veränderung zeigte.

15

Beispiel 12:

Herstellung von Blutpräparationen unter Verwendung eines flüssigen Mediums, in dem sie unlöslich sind

20

Eine wie in Beispiel 1a) hergestellte Faktor VIII-Präparation wurde auf 50 mg Protein/ml eingestellt, mit einer Sindbis-Virussuspension in Zellkulturmedium TCM 199 bzw. mit virusfreiem TCM 199 versetzt und gefriergetrocknet.

25

Das gefriergetrocknete Faktor VIII-Präparat wurde auf einen Wassergehalt von 0,09 eingestellt. Mehrere Behälter mit den gefriergetrockneten Faktor VIII-Proben - mit und ohne Virus - wurden mit je 10 ml wassergesättigtem Chloroform (um den Wassergehalt der Proben nicht zu verändern) versetzt, verschlossen und 10 h lang bei 60°C erhitzt. Je drei Proben wurden vor dem Erhitzen und zu bestimmten Zeiten während des Erhitzungsvorganges zur Messung des Virustiters einerseits und der Restaktivität und des Wassergehaltes andererseits entnommen.

30

35

Vor der Bestimmung des Virustiters und der Restaktivität wurden die Proben vom Lösungsmittel durch Absaugen im

Vakuum befreit.

Die Bestimmung des Virustiters und des Wassergehaltes erfolgte wie in Beispiel 1 beschrieben.

5

Die nach erfolgter Hitzebehandlung gemessenen Virustiter und die nach der Behandlung vorhandene Restaktivität sind der Tabelle XIV zu entnehmen, woraus sich ergibt, daß der Virustiter nach 3 h unter die Nachweisgrenze absank, während  
10 die Restaktivität 0,85 betrug.

In gleicher Weise wurde die Inaktivierung von Hundehepatitisvirus in einer FEIBA- und einer partiellen Prothrombinkomplex-Präparation geprüft, wobei die FEIBA-Präparation nach Beispiel 5a) und die partielle Prothrombinkomplex-Präparation nach Beispiel 3a) hergestellt waren. Die Bestimmung des Virustiters erfolgte, wie in Beispiel 5 beschrieben. Die nach erfolgter Hitzebehandlung gemessenen Virustiter sind aus der Tabelle XIV zu entnehmen.

20

In den folgenden Beispielen wird die Herstellung von Blutprodukten beschrieben, wobei die erfindungsgemäße Inaktivierung angewendet wird, um etwa vorhandene vermehrungsfähige filtrierbare Krankheitserreger unschädlich zu  
25 machen.

Beispiel 13:

Herstellung einer Faktor VIII-Präparation

30 100 l frisch gefrorenes Plasma wurden bei 0°C bis +4°C aufgetaut. Das entstandene Kryopräzipitat wurde durch Zentrifugieren abgetrennt und in 10,5 l Trinatriumcitrat-Lösung, die 50 mg Natriumpentosansulfat/l und 30.000 Einheiten Aprotinin/l enthielt, gelöst. Der pH-Wert der Lösung wurde auf 6,3 und die Temperatur auf +4°C gestellt.  
35 Der entstandene Niederschlag wurde durch Zentrifugieren abgetrennt und verworfen.

Durch Zugabe von Äthanol bis zu einer Konzentration von 0,03 wurde die Faktor VIII-hältige Fraktion ausgefällt. Der entstandene Niederschlag wurde durch Zentrifugieren abgetrennt, in einem Glycin-Citrat-NaCl-Puffer gelöst, gefriergetrocknet, auf einen Wassergehalt von 0,08 gebracht und während 10 h bei 60°C erhitzt. Die Faktor VIII-Aktivitätsbestimmung nach dem Erhitzungsvorgang ergab eine Restaktivität von 0,92 (92 %) verglichen mit nicht erhitztem Material.

Zur Herstellung einer galenischen Zubereitung wurde das inaktivierte Pulver mit destilliertem Wasser unter Zusatz von Glycin-Trinatriumcitrat-NaCl so gelöst, daß eine Lösung mit 25 IE Faktor VIII pro ml, 10 g Glycin/l, 10 g Trinatriumcitrat- $2H_2O$ /l und 5 g Natriumchlorid/l resultierte. Nach Einstellung des pH-Wertes auf 7,0 wurde die Lösung sterilfiltriert, mit 20 ml pro Flasche in die Endbehälter verfüllt und gefriergetrocknet. Die Faktor VIII-Aktivitätsbestimmung des gefriergetrockneten Materials in Endbehältern ergab 480 IE Faktor VIII/Flasche.

#### Beispiel 14:

Herstellung einer Faktor VIII-Präparation nach Entfernung von während der Inaktivierung gebildeten Neoproteinen

46 l frisch gefrorenes Plasma wurden bei 0°C bis +4°C aufgetaut. Das entstandene Kryopräzipitat wurde durch Zentrifugieren abgetrennt und in 960 ml einer Tri-Natriumcitratlösung bei 37°C gelöst. Der pH-Wert der Lösung wurde auf 6,3 und die Temperatur auf +4°C gestellt. Der entstandene Niederschlag wurde durch Zentrifugieren abgetrennt und verworfen. Der Faktor VIII-hältige Überstand wurde gefriergetrocknet, das Lyophilisat auf einen Wassergehalt von 0,075 (7,5 %) eingestellt und 10 h bei 60°C hitzeinaktiviert, um etwa vorhandene vermehrungsfähige filtrierbare Krankheitserreger, wie Hepatitisviren, zuverlässig



unschädlich zu machen. Die Faktor VIII-Aktivitätsbestimmung nach dem Erhitzen ergab eine Restaktivität von 0,95 (95 %) Faktor VIII im Vergleich zu nicht erhitztem Material.

5

Proben der nicht erhitzten und der erhitzten gefriergetrockneten Faktor VIII-Präparation wurden mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese untersucht. Bei der nicht erhitzten Probe wurde das in Fig. 4 mit a bezeichnete Bandenmuster erhalten. Bei der erhitzten Probe ergab sich das in Fig. 4 mit b bezeichnete Bandenmuster, bei welchem die mit  $N_1$ ,  $N_2$  und  $N_3$  bezeichneten Banden in Erscheinung traten, die dem Auftreten von Neoproteinen während der Inaktivierungshitzebehandlung zuzuschreiben sind. Diese Neoproteine sind erfindungsgemäß durch eine Nachbehandlung der erhitzten Faktor VIII-Präparationen zu entfernen. Die Nachbehandlung bzw. weitere Fraktionierung erfolgte durch Auflösen der erhitzten Faktor VIII-Präparation in 900 ml Wasser und Zugabe von Äthylalkohol bis zu einer Konzentration von 0,10. Dabei wurde eine Faktor VIII-hältige Fraktion ausgefällt, durch Zentrifugieren abgetrennt und in einem Glycin-Citrat-NaCl-Puffer gelöst. Die Lösung wurde in eine galenische Zubereitung übergeführt, wie in Beispiel 13 beschrieben.

25

Die SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese der gereinigten Fraktion ergab das in Fig. 4 mit d bezeichnete Bandenmuster: die Untersuchung des Überstandes der 0,10-Alkoholfällung ergab das mit c bezeichnete Bandenmuster. Daraus ist ersichtlich, daß die Neoproteine  $N_1$ ,  $N_2$  und  $N_3$  im Überstand der Alkoholfällung verblieben, während die gereinigte Faktor VIII-Präparation diese Banden nicht mehr enthielt. Bei der beschriebenen Alkoholfraktionierung werden auch andere Proteine entfernt. Die Faktor VIII-Aktivität in der fraktionierten Präparation ist im wesentlichen, nämlich zu 0,70, erhalten geblieben.

35

Die erfindungsgemäße Hitzeinaktivierungsbehandlung kann bis zu 100 h ausgedehnt werden, ohne die Aktivitäten zu verlieren. Die Stabilität wichtiger Gerinnungsfaktoren beim Erhitzen bis zu 100 h bei bestimmten, im Rahmen der Erfindung einzuhaltenden Temperatur- und Wassergehalte ist aus Tabelle XV zu ersehen.

Beispiel 15:

Herstellung einer Faktor VIII-Präparation unter Verwendung von Schutzgas

Eine in gleicher Weise wie in Beispiel 1 hergestellte Faktor VIII-hältige Lösung wurde mit einer Sindbis-Virus-suspension in Zellkulturmedium TCM 199 bzw. mit virus-freiem TCM 199 versetzt und gefriergetrocknet.

Das gefriergetrocknete Faktor VIII-Konzentrat wurde auf einen Wassergehalt von 0,08 (8 Gew.%) eingestellt, durch dreimaliges Evakuieren auf 100 mbar und nachfolgendes Begasen mit Luft, Stickstoff, Helium bzw. Argon in verschiedene "Atmosphären" gebracht und in geschlossenen Behältern bei einer Temperatur von 80°C verschieden lang erhitzt. Von jeder Variante wurden je drei Proben vor dem Erhitzen und zu bestimmten Zeiten während des Erhitzungsvorganges zur Messung des Virustiters einerseits und der Restaktivität an Faktor VIII und des Wassergehaltes andererseits entnommen.

Die Bestimmung des Virustiters, der Restaktivität an Faktor VIII und des Wassergehaltes erfolgte, wie in Beispiel 1 beschrieben; die Resultate sind der Tabelle XVI zu entnehmen. Daraus ist ersichtlich, daß die Restaktivitäten bzw. Ausbeuten an Faktor VIII beim Erhitzen in einer Inertgasatmosphäre (Stickstoff, Helium, Argon) wesentlich höher sind als beim Erhitzen in Luft. Die Geschwindigkeit der Virusinaktivierung ist hingegen unabhängig von der Atmo-

sphäre, in der erhitzt wurde.

Beispiel 16:

Herstellung einer den partiellen Prothrombinkomplex ent-  
5 haltenden Präparation unter Verwendung von Schutzgas

Eine in gleicher Weise wie in Beispiel 3 hergestellte  
Präparation, welche die Gerinnungsfaktoren II, IX und  
X enthielt, wurde mit einer Sindbis-Virussuspension in  
10 Zellkulturmedium TCM 199 bzw. mit virusfreiem TCM 199  
versetzt und gefriergetrocknet. Das gefriergetrocknete  
Konzentrat wurde auf einen Wassergehalt von 0,08 einge-  
stellt, durch dreimaliges Evakuieren auf 100 mbar und  
nachfolgendes Begasen mit Luft, Stickstoff, Helium und  
15 Argon in verschiedene "Atmosphären" gebracht und in ge-  
schlossenen Behältern bei einer Temperatur von 90°C ver-  
schieden lang erhitzt. Von jeder Variante wurden je drei  
Proben vor dem Erhitzen und zu bestimmten Zeiten während  
des Erhitzungsvorganges zur Messung des Virustiters einer-  
20 seits und der Restaktivität an Faktor IX und des Wasser-  
gehaltes andererseits entnommen.

Die Bestimmung des Virustiters und des Wassergehaltes  
erfolgte, wie in Beispiel 1 beschrieben, die Bestimmung  
25 der Restaktivität an Faktor IX erfolgte, wie in Beispiel  
3 beschrieben.

Die Resultate sind der Tabelle XVII zu entnehmen. Daraus  
ist ersichtlich, daß die Restaktivitäten bzw. Ausbeuten  
30 an Faktor IX beim Erhitzen in einer Inertgasatmosphäre  
(Stickstoff, Helium, Argon) wesentlich höher sind als  
beim Erhitzen in Luft. Die Geschwindigkeit der Virusin-  
aktivierung ist hingegen unabhängig von der Atmosphäre,  
in der erhitzt wurde.

Faktor VIII-Präparation Tabelle I

Wasser- gehalt	Temperatur °C	Sindbisvirustiter ( $\log_{10}$ TCID <sub>50</sub> ) nach Erhitzen während								Restaktivität Faktor VIII nach Erhitzen während			
		0	0,1	0,3	1	3	10	30 h	0,3	1	3	10	30 h
0,50	60	5,1	2,6	<1	<1	<1	<1		0,80	0,59	0,38		
0,30	60	5,2		2,9	<1	<1	<1		0,95	0,86	0,80		
0,20	60	5,1		3,1	<1	<1	<1		1,00	0,95	0,92		
0,08	60	5,0	4,7	3,6	2,0	<1	<1		1,00	1,00	1,00		
0,08	80	4,9	<1	<1	<1	<1	<1		0,97	0,89			

5

10

Tabelle I a)

0,015	60	3,7	3,7	2,7	<1	<1	1,00	1,00
0,006	60	4,1	3,4	2,9	1,4	<1	1,00	1,00

15

Faktor VIII-Präparation

Tabelle II

5	Gehalt an		Temperatur °C	Sindbis-Virustiter ( $\log_{10}$ TCID <sub>50</sub> ) nach Erhitzen während						Restaktivität Faktor VIII nach Erhitzen während			
	Methanol	Wasser		0	1	3	10	30 h	1	3	10	30 h	
10	0,10	0,005	60	4,8 4,9 3,5 < 1,5 < 1,5						1,00 1,00 1,00 0,90			

Tabelle IIa

	0,005	60	5,1 5,3 4,6 3,6 2,1	1	1	1	1
--	-------	----	---------------------	---	---	---	---

Tabelle III

Faktor VIII-Präparation

Gehalt an Mannit/Wasser		Temperatur °C	Sindbis-Virustiter (log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> ) nach Erhitzen während					Restaktivität Faktor VIII nach Erhitzen während			
			0	1	3	10	30 h	1	3	10	30 h
0,10	0,002	60	6,6	5,6	5,0	4,0	<1	1,00	1,00	1,00	1,00

Tabelle IIIa

15		0,002	60	6,4	6,4	5,9	4,0	2,2	1,00	1,00	1,00	1,00
----	--	-------	----	-----	-----	-----	-----	-----	------	------	------	------

Präparation mit partiellem Pro-  
thrombinkomplex

Tabelle IV

Gehalt an Wasser	Temperatur °C	Bakteriophagen T4-Virustiter (log <sub>10</sub> PFU) nach Erhitzen während			Restaktivität Faktor IX nach Erhitzen während	
		0	1	3	10 h	
0,09	60	2,4	0	0	0	1,00 0,95 0,88

10

Tabelle IVa

0,004	80	2,5	2,3	2,4	2,0	1,00	1,00
0,004	90	2,6	2,7	2,7	2,0	1,00	1,00

15

Präparation mit totalem Pro-  
thrombinkomplex

Tabelle V

Gehalt an Wasser	Temperatur °C	Sindbis-Virustiter ( $\log_{10}$ TCID <sub>50</sub> ) nach Erhitzen während	Restaktivität Faktor IX nach Erhitzen während
		0 0,1 0,3 1 3 h	1 3 h
0,07	60	6,1 5,2 4,8 3,3 <1	1,00 0,97



FEIBA-Präparation

Tabelle VI

Gehalt an Wasser	an Äthanol	Temperatur °C	Sindbis-Virustiter ( $\log_{10}$ TCID <sub>50</sub> nach Erhitzen während	Restaktivität FEIBA nach Erhitzen während
			0 0,05 0,1 0,2 0,3 1 3 10 30 h	0,1 0,3 1 3 10 30 h
0,007	0,10	60	3,9	1,0 1,0 1,0 0,90
0,07		60	4,1	1,0 0,98
0,08		90	4,7 2,9	0,95 0,88

5

10

Tabelle VIA

0,009	60	5,2	4,8 4,8 4,6 1,7	1,0 1,0 1,0 1,0
-------	----	-----	-----------------	-----------------

0159311

FEIBA-Präparation

Tabelle VII

Gehalt an Wasser	Temperatur °C	Hundehepatitis-Virustiter (log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> ) nach Erhitzen während						Restaktivität FEIBA nach Erhitzen während				
		0	0,1	0,3	1	3	10	30 h	1	3	10	30 h
0,07	60	3,9	2,6	2,1	<1	<1	<1		1,00	0,98		
0,07	80	3,5	<1	<1	<1	<1	<1		0,87	0,75		

5

10

Tabelle VIIa

0,015	60	4,8	4,2	4,0	3,4	2,3	1,00	1,00
-------	----	-----	-----	-----	-----	-----	------	------

Immunglobulin-hältige Präparation Tabelle VIII

Gehalt an Wasser	Temperatur °C	Sindbis-Virustiter ( $\log_{10}$ TCID <sub>50</sub> ) nach Erhitzen während					molekulare Integrität
		0	1	2	4	10 h	
0,054	60	6,4	5,5	4,4	3,0	<1	keine Veränderung gegenüber nicht erhitzten Kontrollproben

C<sub>I</sub>-Esterase-Inhibitor-Präparation Tabelle IX

Gehalt an Wasser	Temperatur °C	Sindbis-Virustiter ( $\log_{10}$ TCID <sub>50</sub> ) nach Erhitzen während					Restaktivität (chromogenes Substrat) nach Erhitzen während
		0	1	2	4	10 h	
0,10	60	6,4	5,0	4,5	3,0	<1	0,99
							0,98
							0,96
							0,93

Plasminogen-hältige Präparation Tabelle X

Gehalt an Wasser	Temperatur °C	Sindbis-Virustiter ( $\log_{10}$ TCID <sub>50</sub> ) nach Erhitzen während					Restaktivität Plasminogen nach Erhitzen während		
		0	1	2	5	h	1	2	5 h
0,058	60	5,6	4,5	3,7	<1,5		-	0,94	1,02

5

Plasmapräparation Tabelle XI

Gehalt an Wasser	Temperatur °C	Sindbis-Virustiter ( $\log_{10}$ TCID <sub>50</sub> ) nach Erhitzen während			Restaktivität aPTT nach Erhitzen während	
		0	0,3	1 h	0,3	1 h
0,052	60	5,4	<1	<1	0,97	0,91

Tabelle XII

Fibrinogen- und Fibronectin-  
hältige Präparation

Gehalt an Wasser	Temperatur °C	Sindbis-Virustiter ( $\log_{10} \text{TCID}_{50}$ ) nach Erhitzen während				Restaktivität: Thrombinzeit ( $c_1$ ) clottierbares Protein ( $c_2$ ) nach Erhitzen während
		0	1	2	5 h	
0,063	60	4,9 2,9 1,5 <1				$c_1$ 0,80 0,80 0,70
						$c_2$ 0,91 0,85 0,73

Albumin-hältige Präparation

Tabelle XIII

Gehalt an Wasser	Temperatur °C	Hundehepatitis-Virustiter ( $\log_{10}$ TCID <sub>50</sub> ) nach Erhitzen während				molekulare Integrität
		0	1	2	4 h	
0,07	60	3,2	<1	<1	<1	keine Veränderung gegenüber nicht erhitzten Kontrollproben

Faktor VIII-Präparation

Tabelle XIV

Gehalt an Wasser	Temperatur °C	Sindbis-Virustiter ( $\log_{10} \text{TCID}_{50}$ ) nach Erhitzen während			Restaktivität Faktor VIII nach Erhitzen während 3 h
		0	0,3	1	3 h
0,09	60	3,9	4,6	2,9	<1
					0,85

FEIBA-Präparation

Gehalt an Wasser	Temperatur °C	Hundehepatitis-Virustiter ( $\log_{10} \text{TCID}_{50}$ ) nach Erhitzen während			Restaktivität FEIBA nach Erhitzen während 3 h
		0	0,1	0,3	1
0,08	60	2,9	2,0	2,0	2,1
					<1
					0,83

Partielle Prothrombinkomplex-Präparation

Gehalt an Wasser	Temperatur °C	Hundehepatitis-Virustiter ( $\log_{10} \text{TCID}_{50}$ ) nach Erhitzen während			Restaktivität Faktor IX nach Erhitzen während 3 h
		0	0,1	0,3	1
0,08	60	2,6	1,8	<1	<1
					<1
					0,87

0159311

Tabelle XV

Stabilität der Gerinnungsfaktoren

Produkt	Gehalt an Wasser	Temperatur °C	Restaktivität nach Erhitzen während		
			10	30	100 h
Faktor VIII-Konzentrat	0,08	60	0,94	0,85	0,47 Faktor VIII
FEIBA	0,07	60	0,95	0,82	0,67 FEIBA
Totaler Prothrombin-komplex	0,07	60	0,91	0,79	0,38 Faktor IX
Partieller Prothrombin-komplex	0,09	60	0,88	0,73	0,33 Faktor IX

5

10

0159311

Tabelle XVI

Faktor VIII-Präparation

Wasser- gehalt	Tempera- tur °C	Atmo- sphäre	Sindbis-Virustiter (logTCID <sub>50</sub> ) nach Erhitzen während					Restaktivität nach Erhitzen während			
			0	0,3	1	3	10 h	1	3	10 h	
5											
10	0,08	Luft	4,8	<1	<1	<1	<1	0,85	0,53	0,28	
	0,08	Stick- stoff	5,0	<1	<1	<1	<1	0,95	0,83	0,60	
	0,08	Helium	4,7	<1	<1	<1	<1	0,97	0,85	0,62	
	0,08	Argon	4,9	<1	<1	<1	<1	0,98	0,85	0,62	



0159311

Tabelle XVII

Präparation mit partiellem Prothrombinkomplex

Wasser- gehalt	Tempera- tur °C	Atmo- sphäre	Sindbis-Virustiter (TCID <sub>50</sub> ) nach Erhitzen während					Restaktivität Faktor IX nach Erhitzen während		
			0	0,3	1	3	10 h	1	3	10 h
5  10  15	0,08	Luft	4,7	<1	<1	<1	<1	0,63	0,30	0,07
	0,08	Stick- stoff	4,9	<1	<1	<1	<1	0,82	0,55	0,22
	0,08	Helium	5,1	<1	<1	<1	<1	0,75	0,47	0,14
	0,08	Argon	4,8	<1	<1	<1	<1	0,70	0,42	0,12

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Inaktivierung von vermehrungsfähigen  
filtrierbaren Krankheitserregern in Blutprodukten un-  
ter Anwendung erhöhter Temperatur, dadurch gekennzeich-  
net, daß die Blutprodukte in feuchtem oder in festem  
5 Zustand in Gegenwart von anorganischen oder organischen  
hydroxylgruppenhaltigen Verbindungen mit einer H<sup>+</sup>-  
Dissoziationskonstante von  $<10^{-11}$  bei einer Temperatur  
im Bereich bis zu 121°C hitzebehandelt werden, wobei  
die Konzentration der hydroxylgruppenhaltigen Verbin-  
10 dungen größer als 0,05 (5 Gew.%) und kleiner als 0,70  
(70 Gew.%) ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,  
daß die vermehrungsfähigen filtrierbaren Krankheitserre-  
15 ger Hepatitis-Viren oder unbekannte Überträger von  
AIDS (acquired immune deficiency syndrome) sind.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,  
daß die Blutprodukte während einer Dauer von 1 s bis  
20 100 h erhitzt werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1 und 3, dadurch gekennzeich-  
net, daß als hydroxylgruppenhaltige Verbindungen Wasser,  
Methanol, Äthanol oder Mannit eingesetzt werden, wobei  
25 die Konzentration dieser Verbindungen größer als 0,05  
bis kleiner als 0,40 ist.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet,  
daß die Hitzebehandlung an Präparationen, die 0,06  
30 bis 0,30 Wasser enthalten, bei einer Temperatur von  
50 bis 90°C durchgeführt wird.
6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekenn-  
zeichnet, daß die Hitzebehandlung der Blutprodukte in

Gegenwart eines sauerstofffreien inerten Schutzgases, vorzugsweise Stickstoff, und allenfalls in Gegenwart von sauerstoffbindenden Substanzen durchgeführt wird.

- 5     7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Blutprodukte in einem flüssigen Medium, in dem sie unlöslich sind, hitzebehandelt werden.
- 10    8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß als flüssiges Medium Chloroform oder Essigsäure-äthylester verwendet wird.
- 15    9. Abgeänderte Ausführungsform nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Blutprodukte mit hydroxylgruppenhaltigen gasförmigen Verbindungen behandelt werden, mit der Maßgabe, daß in den Blutprodukten die Konzentration der hydroxylgruppenhaltigen Verbindungen von größer als 0,05 (5 Gew.%) und kleiner als 0,70 (70 Gew.%), vorzugsweise kleiner als 0,40 (40 Gew.%) erreicht wird.
- 20    10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Blutprodukte in festem Zustand mit Wasserdampf von einem Druck bzw. Partialdruck zwischen 0,1 und 2 bar behandelt werden.
- 25    11. Verfahren zur Herstellung von Blutprodukten, ausgewählt aus Enzymen, Proenzymen einschließlich Gerinnungsfaktoren, Enzyminhibitoren, Immunglobulinen, Albumin, 30    Plasminogen, Fibrinogen, Fibronectin oder Plasma oder Mischungen einzelner Blutprodukte, unter Anwendung des Verfahrens nach den Ansprüchen 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Inaktivierung in einer beliebigen Stufe des Herstellungsverfahrens vorgenommen 35    wird, worauf gegebenenfalls die Blutprodukte in eine galenische Zubereitung übergeführt werden.

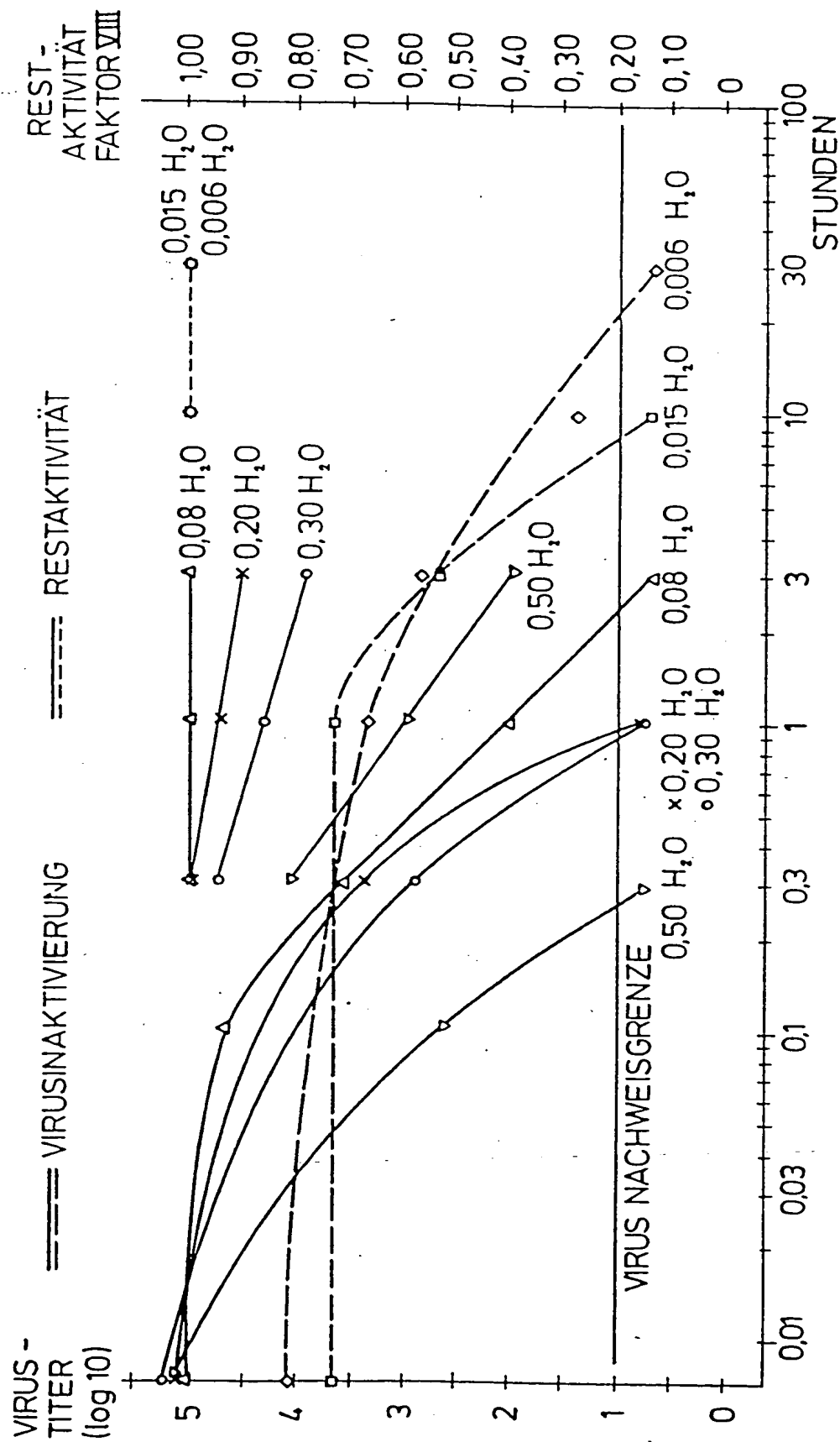
12. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß ein Blutprodukt verwendet wird, welches an eine Matrix kovalent oder nicht-kovalent gebunden ist.
- 5
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß ein Blutprodukt verwendet wird, welches auf einen gewebekompatiblen Träger, wie ein Kollagenvlies, aufgebracht ist.
- 10
14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß eine fibrinogenhaltige Komposition verwendet wird, welche auf einen gewebekompatiblen Träger, wie ein Kollagenvlies, aufgebracht ist.
- 15
15. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die hitzeinaktivierten Blutprodukte durch weitere Fraktionierungsmaßnahmen von während der Hitzeinaktivierung allenfalls gebildeten Neoproteinen oder Neoantigenen befreit werden.
- 20
16. Blutprodukt, ausgewählt aus Enzymen, Proenzymen, einschließlich Gerinnungsfaktoren, Enzyminhibitoren, Immunglobulinen, Albumin, Plasminogen, Fibrinogen, Fibronectin und Plasma, hergestellt durch Fraktionierungsmaßnahmen, dadurch gekennzeichnet, daß in einer beliebigen Stufe des Fraktionierungsverfahrens die Blutproduktkomposition in Gegenwart von hydroxylgruppenhaltigen Verbindungen mit einer  $H^+$ -Dissoziationskonstante von  $< 10^{-11}$  bei einer Temperatur im Bereich bis zu  $121^{\circ}C$ , vorzugsweise im Bereich von  $50$  bis  $121^{\circ}C$ , hitzebehandelt worden ist, wobei die Konzentration der hydroxylgruppenhaltigen Verbindungen größer als  $0,05$  (5 Gew.%) und kleiner als  $0,70$  (70 Gew.%), vorzugsweise kleiner als  $0,40$  (40 Gew.%), ist.
- 25
- 30
- 35

0159311

- 51 -

17. Galenische Zubereitung enthaltend das Blutprodukt  
nach Anspruch 16.

FIG.1 INAKTIVIERUNG EINES MODELLVIRUS (SINDBIS-VIRUS) UND RESTAKTIVITÄT VON FAKTOR VIII BEIM ERHITZEN EINER FAKTOR VIII - PRÄPARATION AUF 60°C



0159311

FIG. 2 INAKTIVIERUNG EINES MODELLVIRUS (BAKTERIOPHAGE T4) UND RESTAKTIVITÄT VON FAKTOR IX BEIM ERHITZEN EINER PARTIELLEN-PROTHROMBINKOMPLEX — PRÄPARATION

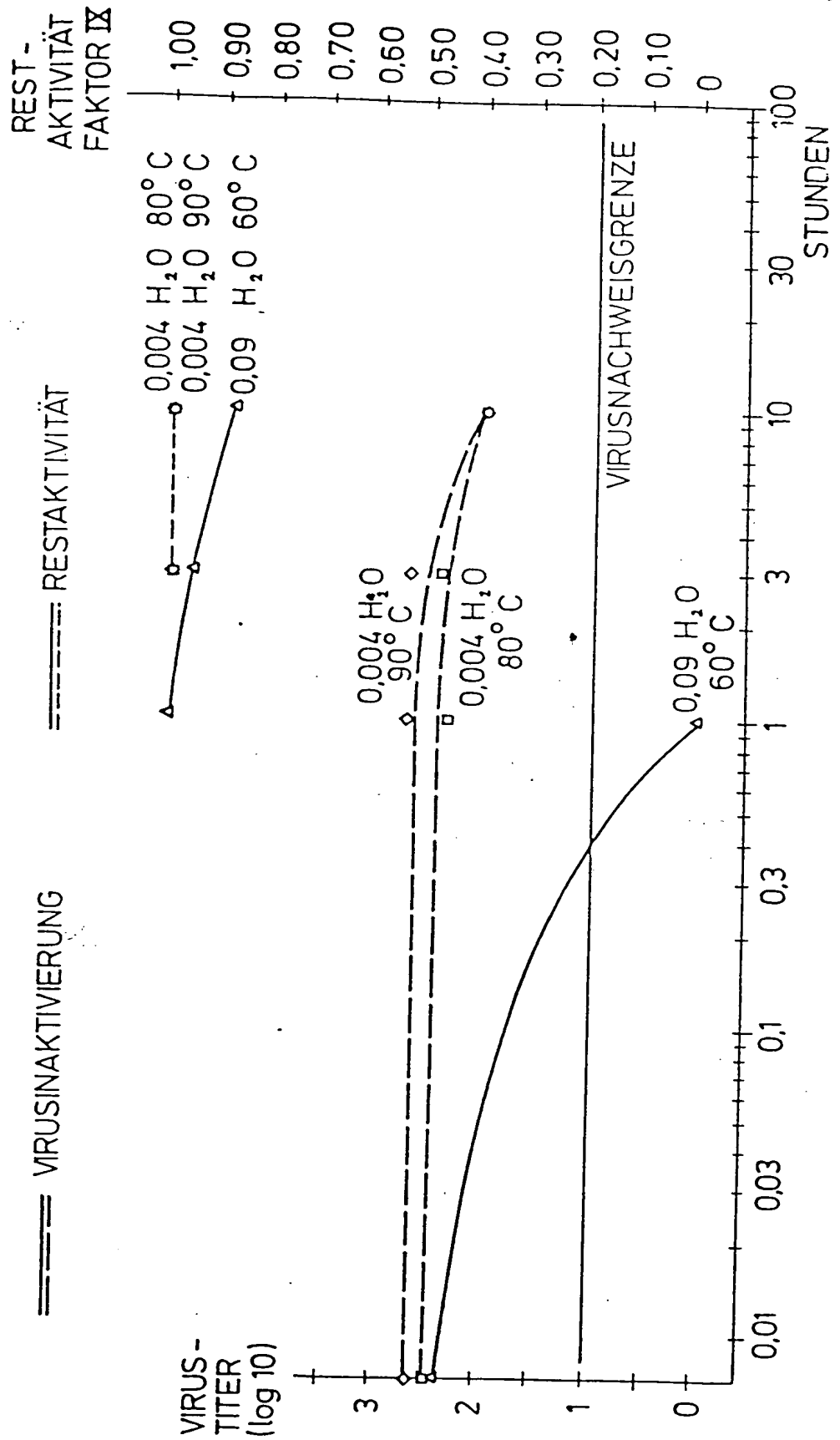


FIG. 3 INAKTIVIERUNG EINES MODELLVIRUS (HUNDEHEPATITIS - VIRUS) UND FEIB-REST-  
AKTIVITÄT BEIM ERHITZEN EINER FEIBA -PRÄPARATION AUF 60° C

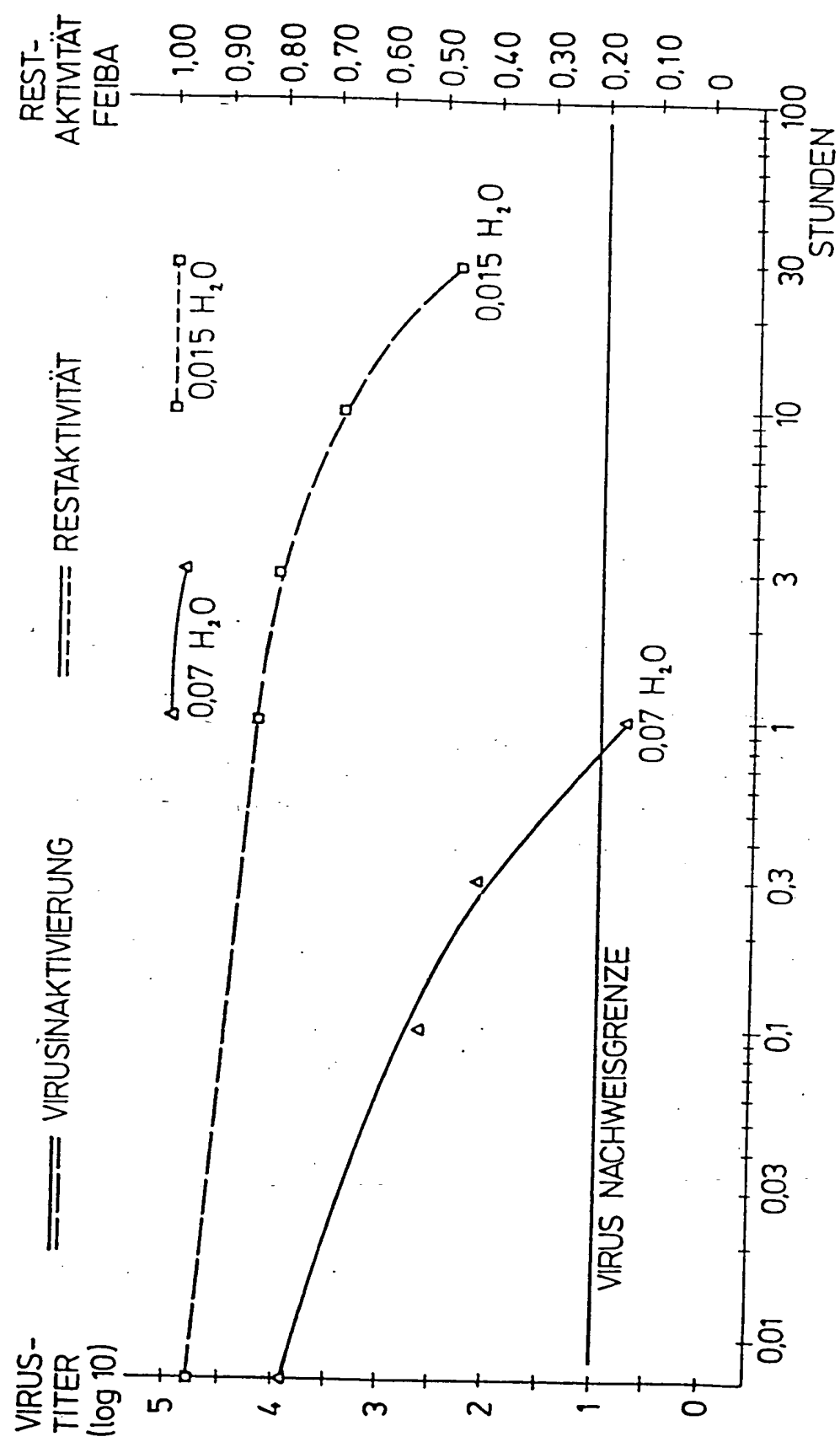
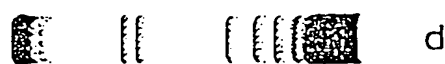
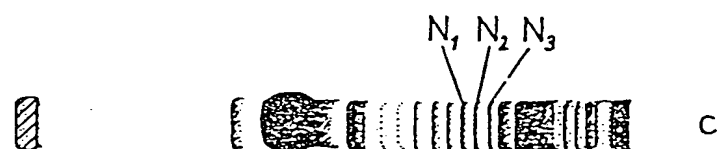
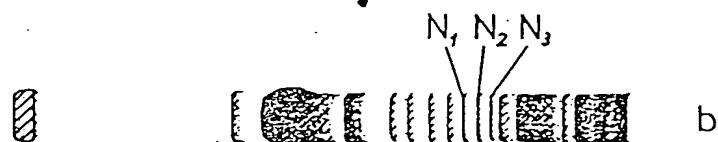
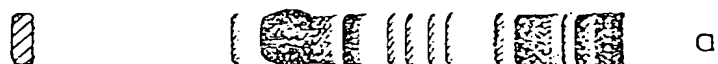




FIG. 4





Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

0159311  
Nummer der Anmeldung

EP 85 89 0044

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 4)
D,X	WO-A-8 203 871 (BAXTER TRAVENOL LABORATORIES, INC.)  * Seite 6, Zeilen 11-15; Ansprüche 1-16,33 *	1-4,6-9,12-15,17	A 61 L 2/04 // A 61 K 35/16
Y		11,16	
D,Y	EP-A-0 094 611 (CEDARS-SINAI MEDICAL CENTER) * Ansprüche 1-62 *	11,16	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl. 4)
			A 61 L 2/04
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 02-08-1985	Prüfer PELTRE CHR.
<b>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN</b> X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			